

성향정기산이 흰쥐의 MCAO에 의한 국소뇌허혈에 미치는 영향

김효선 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Neuroprotective Effect of Sunghyangjungki-San on Focal Cerebral Ischemia Induced by MCAO in Rats

Hyo Sun Kim, Youn Sub Kim*

Department of Anatomy-Pointlogy College of Oriental Medicine, Kyungwon University

This study evaluated neuroprotective effect of Sunghyangjungki-San (SHS) on the focal cerebral ischemia. The rats were induced infarct in cerebral cortex and caudoputamen by using temporal occlusion of the middle cerebral artery (MCAO), then water extract of SHS was treated for MCAO rats. Neuroprotective effect was evaluated by neurological score, infarct sizes and total volume, positive neurons against Bax, Caspase-3, HSP-72, and HIF-1 α in infarct area with immunohistochemistry. The results obtained were as follows: Treatment of SHS improved neurological score of MCAO rats, but there was not a statistical significance. Treatment of SHS reduced significantly infarct sizes in the brain sections of MCAO rats. Treatment of SHS reduced significantly total volume of infarct of MCAO rats. Treatment of SHS reduced significantly Bax positive neurons in penumbra of cerebral cortex of MCAO rats. Treatment of SHS reduced significantly Caspase-3 positive neurons in caudoputamen and penumbra of cerebral cortex of MCAO rats. Treatment of SHS reduced significantly HSP-72 positive neurons in penumbra of cerebral cortex of MCAO rats. Treatment of SHS reduced significantly IF-1 α positive neurons in penumbra of cerebral cortex of MCAO rats.

Key words : Sunghyangjungki-San, MCAO, Focal Cerebral Ischemia

서 론

중풍 즉 뇌졸중은 뇌혈전, 뇌색전, 뇌출혈 등 뇌혈관 질환의 일종으로 그 중 허혈성 뇌경색이 약 80%를 차지한다. 뇌졸중 발병시, 사망에 이르지 않더라도 뇌조직은 재생되지 않으므로 출혈이나 경색이 있었던 부위에는 섬유교증 반흔을 남기며, 편마비, 언어장애, 인지장애 등 많은 후유증을 남기게 된다.¹⁾ 연구 보고에 의하면 뇌동맥 폐쇄 1시간 이내에 뇌혈류가 재개통되면 약 24시간 이후에 나타나는 뇌경색의 형성이 방지될 수 있다고 하였고,^{2,3)} 또한 대뇌피질과 선조체에서는 뇌허혈 후 6시간에서 12시간 사이에 최대의 신경세포의 손상이 일어나 급격하게 뇌경색 크기가 증가한다고 하였다.^{4,5)} 이러한 사실은 뇌허혈 유발시 초기에 뇌의 신경세포 손상을 최대한 줄이는 것이 가장 효과적인 대

처방법임을 의미한다.⁶⁾

한의학에서는 중풍에 대하여 거풍, 조기, 거답하거나 기혈을 소통시키는 효능의 처방들을 주로 사용한다.⁷⁾ 성향정기산은 광향정기산에 목향과 남성을 가미한 처방으로, 康⁸⁾의 <濟衆新編>에 처음으로 처방명이 기록되었으며, 理氣 祛瘀하는 효능이 있어 卒中風, 昏倒, 痰塞多涎한 症을 나타내는 중풍초기에 구급처방으로 널리 사용되어 왔다.^{8,9)} 성향정기산에 대한 연구보고를 살펴보면, 조 등¹⁰⁾이 혈관 확장작용이 있다고 보고하였으며, 이와 김¹¹⁾, 김 등¹²⁾ 및 김 등¹³⁾이 혈관 내피세포 및 평활근세포에 미치는 영향을 보고하였고, 이와 김¹⁴⁾은 혈압 및 국소뇌혈류량, 임 등¹⁵⁾은 뇌부종, 예 등¹⁶⁾은 뇌허혈을 유발시킨 백서의 신경전달물질, 김 등¹⁷⁾은 저산소 발작상태의 대뇌피질 절편에서 이온함량과 대사에 대하여 각각 유의한 효능이 있음을 보고한바 있다.

본 연구에서는 위와 같은 효능의 성향정기산이 뇌경색 유발 초기에 나타내는 효능을 뇌경색이 유발된 실험동물에서 직접적으로 관찰하기 위해서, 일시적인 중대뇌동맥폐쇄 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 방법에 의하여 뇌경색을 유발

* 교신저자 : 김연섭, 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학

· E-mail : ysk@kyungwon.ac.kr, · Tel : 031-750-5420

· 접수 : 2006/04/05 · 수정 : 2006/04/30 · 채택 : 2006/05/25

하고 성향정기산의 물추출액기스를 투여한 다음 신경학적 행동지표와 뇌경색의 크기에 미치는 영향을 관찰하였으며, 뇌경색부위에서 신경세포 자살사기전에 관련된 Bax와 caspase-3,^{18,19)} 뇌경색부위 경계영역을 규정하는 지표가 되는 heat shock protein-72 (HSP-72)²⁰⁾ 및 저산소상태에 대한 조절인자인 hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)의 발현²¹⁾을 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰한바 유의한 뇌신경세포손상 보호효능을 관찰할 수 있었기에 이에 보고하는 바이다.

실험

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 12주령, 약 300g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21~23°C), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 성향정기산 (Sunghyangjungki-San, SHS)⁸⁾으로 약물의 조제는 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여, 10첩 분량 440 g을 3,000 ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 88.7 g의 물추출액기스를 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 체중비례 계산량의 10배인 147.8 mg으로 하였다. 약물은 국소뇌허혈 유발 3시간 전과 6시간 및 18시간 후, 총 3회 경구투여 하였다.

3. 실험군의 구분

뇌허혈 손상에 대한 성향정기산의 효능을 관찰하기 위하여, 실험군은 뇌허혈을 유발하기 위한 수술과정은 시행하였으나 중대뇌동맥을 폐쇄 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 시키지 않은 정상대조군 (Sham), 일시적인 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상을 유발시킨 대조군 (Control) 및 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 유발 후 성향정기산 물추출액기스를 경구투여한 성향정기산투여군 (Sample)으로 나누었다. 각 군 당 실험동물은 12마리씩 배정하였으며, 그 중 6마리는 뇌경색 면적 측정용으로, 나머지 6마리는 면역염색화학염색용으로 사용하였다.

4. 국소뇌허혈의 유발

국소뇌허혈은 Zea Longa 등²²⁾의 방법 즉, 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하는 방법을 사용하였다. 마취는 70% N₂O와 30% O₂의 혼합가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5~2%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5°C로 조절하였다. 전경부의 피부를 절개하고 총경동맥과 외경동맥 및 내경동맥의 분지 부위를 찾아 주위조직을 잘 정리하였다. 외경동맥에 나일론 수술실을 삽입할

수 있도록 입구를 만들고 절단한 다음, 총경동맥의 혈류를 일시적으로 차단한 상태에서, 약 4 cm 길이의 나일론 수술실 (4-0 monofilament, Ethicon, Edinburgh, Scotland)을 내경동맥을 통하여 약 20 mm 까지 천천히 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부가 폐쇄되도록 하였다. 나일론 수술실의 삽입부 끝은 약 0.3 mm 크기로 둥글게 만들었으며, 실험 당일에 0.1% poly-L-lysine으로 코팅하여 사용하였다. 삽입된 나일론 수술실은 혈관과 함께 고정하고, 한쪽 끝은 피부 봉합부위 외부로 약간 노출되도록 한 상태로 전경부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다. 혈류의 재개통을 위하여, 폐쇄 2시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다.

5. 신경학적 행동지표의 측정

각 군의 실험동물 12마리 모두에 대해서 뇌허혈로 인한 신경학적 행동지표 (neurological score) 성적을 국소뇌허혈 유발 6 시간 및 24시간 후에 다음의 기준에 따라 판정하였다.^{23,24)}

Score	Evaluation
0	명확히 관찰할 수 있는 결함이 없음
1	꼬리를 들었을 때 반대쪽 앞다리를 굽곡시킴
2	꼬리를 당겼을 때 반대쪽 앞다리의 악력이 감소함
3	꼬리를 당겼을 때만 반대방향 원형돌기를 나타냄
4	지속적인 반대방향 원형돌기를 나타냄

6. 뇌경색 면적 및 체적의 측정

국소뇌허혈을 유발한 실험동물을 pentobarbital sodium을 복강주사하여 깊게 마취한 다음 단두로 희생시키고, 즉시 뇌를 적출하여 흰쥐용 brain matrix (ASI, USA)를 사용하여 2 mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)로 염색하고,²⁵⁾ digital camera로 촬영한 다음 "Image J" software를 사용하여 각 절편으로부터 뇌경색 면적을 측정하고, 측정값으로부터 총체적을 계산하였다.

7. 뇌조직의 처리

국소뇌허혈 유발 24시간 후에 실험동물을 pentobarbital sodium의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담궈 침전시켰다. 다음 뇌를 -40°C의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

8. Bax, Caspase-3, HSP-72 및 HIF-1α의 염색

실험동물의 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시

쳤다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 각각 Bax (anti-mouse, 1:200, Santa Cruz, USA), Caspase-3 (anti-rabbit, 1:200, Cell Signaling, USA), HSP-72 (anti-mouse, 1:200, Oncogene, USA) 및 HIF-1 α (anti-rabbit, 1:50, Santa Cruz, USA) 이었으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 흐석한 후 4°C에서 overnight으로 반응시켰다.¹⁸⁻²¹⁾ 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl₂·H₂O (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride (Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

9. 면역조직화학염색 양성반응 신경세포의 관찰

Bax, Caspase-3, HSP-72 및 HIF-1 α 발현의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 면역조직화학적으로 염색된 뇌조직의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 "NIH Image" software를 사용하여, 뇌경색이 유발된 대뇌반구 쪽 대뇌피질의 뇌경색 중심부위 (cortex core)와 뇌경색 경계부위 (cortex penumbra) 및 선조체 (caudoputamen)에서 동일한 일정면적 ($137,600 \mu\text{m}^2$) 내에서의 양성반응 신경세포 수를 측정하였다.

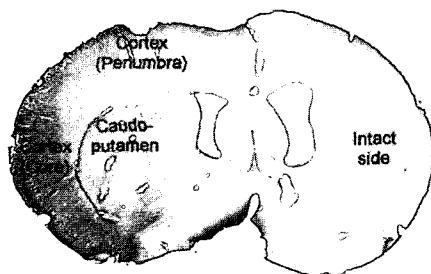


Fig. 1. Schematic diagram of the observed-region of Cortex (Core), Cortex (Penumbra) and Caudoputamen on the coronal brain section of MCAO rat.

실험성적

1. 신경학적 행동지표 성적에 대한 영향

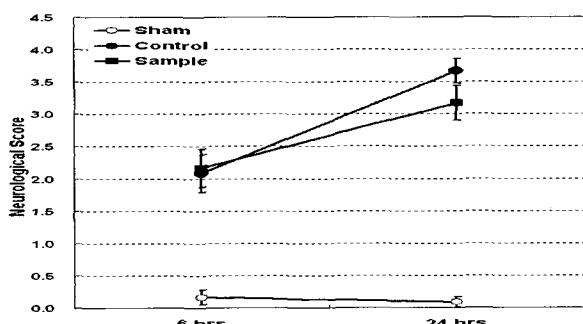


Fig. 2. Effect of SHS on neurological scores of MCAO rats. Sample group demonstrated decrease of the neurological score but it was not significant statistically. Data presented as mean \pm standard error.

2. 뇌경색 면적 및 총체적에 대한 영향

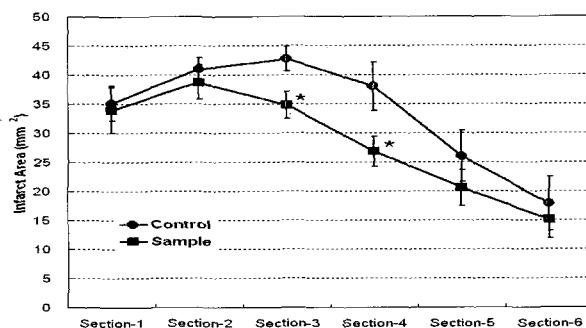


Fig. 3. Effect of SHS on TTC-stained infarct area in brain sections of MCAO rats. Sample group demonstrated significant decrease of the infarct area in 3rd and 4th brain sections as compared to the control group. Data presented as mean \pm standard error (*: P<0.05).

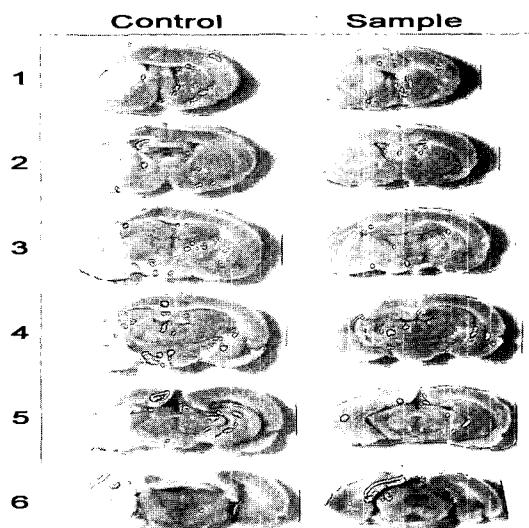


Fig. 4. TTC-stained brain sections of MCAO rats. Section number indicates the sequence from rostral to caudal order. Sample group demonstrated significant decrease of the brain infarct volume as compared to the control group.

3. 뇌 부위별 Bax 양성반응 신경세포 수에 대한 영향

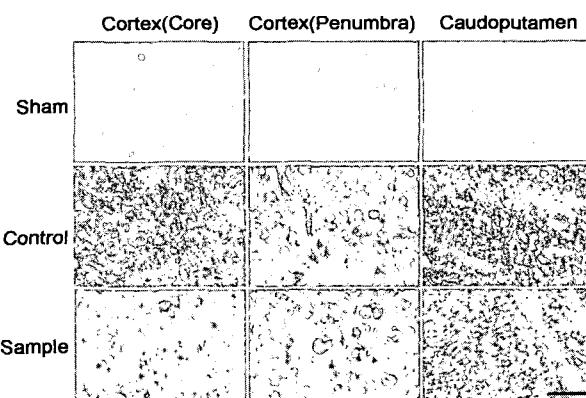


Fig. 5. Brain sections of Bax immunohistochemistry of MCAO rats. Control group showed severe neuronal cell death in Cortex(Core) and Caudoputamen, and significant increase of Bax immuno-reactivity in Cortex(Penumbra). Sample group demonstrated significant decrease of Bax positive cells in Cortex(Penumbra) as compared to the control group.

4. 뇌 부위별 Caspase-3 양성반응 신경세포 수에 대한 영향

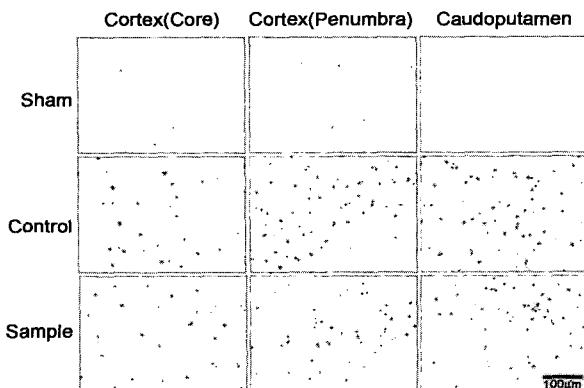


Fig. 6. Brain sections of Caspase-3 immunohistochemistry of MCAO rats. Control group showed severe neuronal cell death in Cortex(Core) and significant increase of Caspase-3 immuno-reactivity in Cortex(Penumbra) and Caudoputamen. Sample group demonstrated significant decrease of Caspase-3 positive cells in Cortex(Penumbra) and Caudoputamen as compared to the control group.

5. 뇌 부위별 HSP-72 양성반응 신경세포 수에 대한 영향

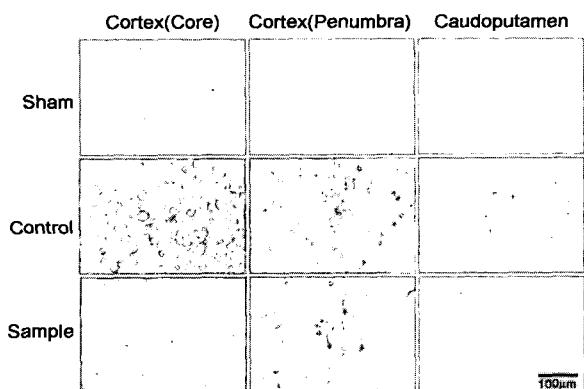


Fig. 7. Brain sections of HSP-72 immunohistochemistry of MCAO rats. Control group showed severe neuronal cell death in Cortex(Core) and Caudoputamen, and significant increase of HSP-72 immuno-reactivity in Cortex(Penumbra). Sample group demonstrated significant decrease of HSP-72 positive cells in Cortex(Penumbra) as compared to the control group.

6. 뇌 부위별 HIF-1α 양성반응 신경세포 수에 대한 영향

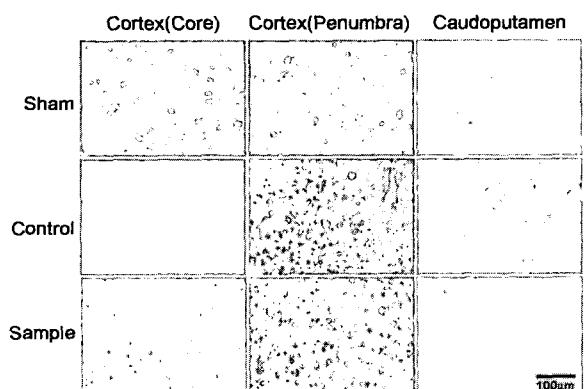


Fig. 8. Brain sections of HIF-1α immunohistochemistry of MCAO rats. Control group showed severe decrease of HIF-1α positive cells in Cortex(Core) and severe increase HIF-1α positive cells in Cortex(Penumbra). Sample group demonstrated significant increase of HIF-1α positive cells in Cortex(Core) and significant decrease of HIF-1α positive cells in Cortex(Penumbra) as compared to the control group.

고찰

성향정기산은 중풍초기의 사용되는 구급처방으로⁹⁾ 혈압 및 뇌혈류에 대한 효능이 실증연구를 통하여 보고된 바 있으며,^{12,14)} 중풍환자에 대한 임상연구에서 입원 후 2-3일에 투약되는 경우가 76.7%로 가장 많았고, 평균 투약 일수가 3.3일이라고 보고되었다.¹⁵⁾ 또한 의식장애, 동공반사 이상, 유두부종, 경부강직 등의 증상을 동반하는 여러 경우의 중풍환자 모두에서 유의한 효능이 있었으며, 뇌경색에 의한 뇌부종을 유의하게 경감시켰다고 보고된 바 있다.¹⁵⁾ 본 연구에서는 이러한 성향정기산이 뇌경색 유발 초기에 나타내는 효능을 뇌경색이 유발된 실험동물에서 직접적으로 관찰하였다.

중풍 연구에 이용되는 실험동물의 뇌허혈 모형은 전뇌허혈 (global cerebral ischemia)과 국소뇌허혈 (focal cerebral ischemia) 모형으로 대별된다.²⁶⁾ 전뇌허혈 모형에서는 뇌경색 (infarct)이 유발되지 않는 단점이 있으나 뇌허혈에 의한 지연성신경세포사망 (delayed neuronal cell death)의 기전을 연구하는데 많은 장점이 있다.²⁷⁾ 국소뇌허혈 모형은 중대뇌동맥을 폐쇄하여 대뇌피질 및 선조체 부위에 뇌경색을 유발시키는 모형이다. 이 모형은 대뇌피질에서 신경세포의 분포와 혈류 및 대사적 차이에 의하여 뇌경색 중심부 (infarct core)와 경계부위 (penumbra)로 구분되는 확실한 뇌경색이 유발되며, 선조체 (caudoputamen)에도 뇌경색이 유발되므로 신경학적 운동기능의 실조까지를 동반한다.²⁸⁾ 그러므로 중풍과 중풍에 대한 한약처방의 효능 및 기전 연구에 보다 적합한 실험모형이라고 판단되어 본 실험에서는 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄하는 국소뇌허혈 모형을 사용하였다.

중대뇌동맥폐쇄에 의하여 유발되는 뇌경색은 대뇌피질은 물론 선조체 부위에도 뇌경색을 유발하므로 신경학적 운동장애가 유발된다.²⁹⁾ 뇌경색이 유발된 뇌의 부위와 크기 등에 따라 다양한 행동 및 운동장애가 유발되며, 이러한 신경학적 행동 및 운동장애는 뇌허혈의 병리생리적 기전과 명확한 상관성을 가지고 있다.³⁰⁾ 특히 중풍환자의 임상의 치료 목표 중 하나가 중풍환자의 운동기능 장애를 개선하는 것이고, 이화학적 및 조직병리학적 검사만으로는 운동기능의 개선을 정확히 검증할 수 없다는 특징을 감안할 때 신경학적 행동지표 (neurological score)의 측정은 중요한 의의를 갖는다.

본 실험에서 MCAO에 의하여 뇌허혈이 유발된 24시간 후에 신경학적 행동지표를 측정한바, 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 13.6% 정도의 신경학적 행동지표의 개선을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

또한 뇌경색 유발 24시간 후에 TTC로 염색된 뇌조직 절편에서 뇌경색이 유발된 부위의 면적을 측정한 결과는 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 세 번째와 네 번째 뇌조직 절편에서 유의한 뇌경색 면적의 감소를 나타내었으며, 뇌경색의 총체적 또한 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 MCAO에 의하여 대뇌피질과 선조체가 포함되는 광범위한 뇌경색이 유발되었고, 성향정기산이 일정의 뇌경색 유발 억제효능을 나타낸 것을 보여준다. 나아가 신경학적 행동지표를 유의하게 개선시키지 못

하였고, 뇌조직 절편 중 전뇌 쪽 선조체가 위치하는 첫 번째와 두 번째 절편에서 유의한 뇌경색 감소를 나타내지 못한 것으로 보아, 성향정기산은 선조체의 뇌경색 보다는 주로 대뇌피질의 뇌경색에 유의하게 작용하는 것으로 생각할 수 있다.

성향정기산의 작용기전을 알아보기 위해서, 뇌경색 부위에서 신경세포의 자연사 기전에 관련된 Bax와 caspase-3, 뇌경색부위 경계영역을 규정하는 지표가 되는 heat shock protein-72 (HSP-72) 및 저산소 상태에 대한 조절인자인 hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)의 발현을 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰하였다.

신경세포의 자연사에 대한 생화학적 및 분자생물학적 기전이 아직 완전히 밝혀지지는 않았지만 지금까지 알려진 것 중 가장 명확한 기전이 caspase와 Bax/Bcl-2의 작동이다. Bax는 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)와 함께 세포자연사를 조절하는 인자이다.³¹⁾ Bax가 과도하게 발현될 경우 mitochondria로부터 cytochrome C를 분비하게 하여 세포가 자연사 과정을 일으키게 한다는 것은 잘 알려진 사실이다.³²⁾ 특히 뇌허혈과 같은 다양한 세포 외부로부터의 유해자극에 대하여 신경세포의 손상 가능성 여부를 결정하거나, 자연사가 일어나는 신경세포에서 장차 신경세포가 사망할 것이라는 것을 판별할 수 있는 중요한 지표로 사용되고 있다.³³⁾

Caspase-3는 괴사 (necrosis)에 의한 세포사망의 경우에는 활성화되지 않으며, caspase-3 활성화가 세포자연사를 촉진하고, caspase-3에 관련된 protease의 억제가 세포자연사를 억제한다.³⁴⁾ 연구 보고에서, 뇌허혈 유발 이후 2시간에서 12시간 사이에 caspase inhibitor를 주입한 경우 유의한 신경세포손상 보호효능을 나타내었다고 하였다.³⁵⁾

본 실험의 결과, 뇌경색이 유발된 뇌부위를 대뇌피질 뇌경색의 중심부, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 및 선조체 부위로 나누어 Bax 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정한 바, 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서만 유의성 있는 Bax 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. Caspase-3 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정한 결과는 대조군에 비하여 대뇌피질 뇌경색의 경계부위와 선조체부위에서 유의성 있는 Caspase-3 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 성향정기산이 뇌허혈에 의한 대뇌피질 뇌경색 경계부위의 신경세포 자연사를 억제하는 효능이 있음을 나타낸다. 선조체에서 caspase-3의 발현을 유의하게 억제하였으나 Bax 발현의 억제는 유의하지 못한 것으로 보아 성향정기산의 선조체에 대한 영향은 명확하지 못하였다.

Heat-shock protein (HSP)은 스트레스유발 단백질 (stress-induced proteins)의 일종이며, heat-shock gene은 열충격이나 허혈 또는 각종 스트레스 등 변성단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 그 발현이 증가된다.³⁶⁾ 그러므로 HSP-72 발현은 뇌허혈의 penumbra를 규정하거나 뇌허혈 영역 중에서 단백질변성구역 (zone of protein denaturation)을 결정하는 지표로 사용된다.³⁷⁾

본 실험의 결과, 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서는 유의성은 없었지만 HSP-72 양성반응 신경세포 수가 증가하는 경향을 나타내었고, 대뇌피질 뇌경색

의 경계부위에서는 유의성 있는 HSP-72 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 HSP-72의 상보적 발현 양상과 함께 한약물 효능의 상보적인 작용에 의한 것으로 생각할 수 있으며, 결과적으로 성향정기산은 대뇌피질 뇌경색의 경계부위를 감소시킴으로써 뇌경색의 확장을 억제하는 효능이 있는 것으로 판단된다. HIF-1 α 는 저산소 상태에서 특이적으로 발현되는 전사인자 (transcription factor)로서, 뇌허혈에 대하여 neuroprotective 효능과 함께 apoptosis를 유발하는 유해한 작용이 있다는 상반된 연구가 보고되어 있다.^{38,39)} HIF-1 α 의 neuroprotective 효능은 사전적응 (preconditioning) 상태에서 위의 gene들 중 특히 erythropoietin과 VEGF의 보상적인 작동에 관련되어 나타나는 것으로 알려져 있다.³⁹⁾

본 실험의 결과, 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서는 유의성 있는 HIF-1 α 양성반응 신경세포 수의 증가를 나타내고, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서는 유의성 있는 HIF-1 α 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 이러한 결과 또한 HIF-1 α 의 상보적 발현 양상과 함께 한약물 효능의 상보적인 작용에 의한 것으로 생각할 수 있으며, 한편으로는 HIF-1 α 가 세포질에서 발현되는 특성상 뇌경색의 중심부에 위치한 신경세포들은 심한 뇌허혈 손상으로 위축 또는 사망하였으므로 대조군에서의 HIF-1 α 발현이 너무 낮은 때문으로도 생각할 수 있다. 또한 이러한 결과는 뇌허혈로 인하여 뇌경색이 유발될 때 성향정기산이 저산소에 대한 뇌조직의 저항성을 증강시키는 일정의 효능이 있는 것으로도 해석할 수 있다.

결 론

성향정기산이 국소뇌허혈에 의한 뇌경색에 미치는 효능을 연구하기 위해서, 실험동물에 일시적인 중대뇌동맥의 폐쇄에 의하여 대뇌피질과 선조체 일부에 뇌경색을 유발시킨 후 성향정기산의 물추출액시스템을 투여한 다음 신경학적 행동지표 성적, 뇌경색의 크기 및 총체적, 뇌 부위별 Bax, Caspase-3, HSP-72 및 HIF-1 α 양성반응 신경세포 수의 변화를 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 신경학적 행동지표의 개선을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 유의한 뇌경색 면적의 감소를 나타내었다. 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 유의한 뇌경색 총체적의 감소를 나타내었다. 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 유의한 Bax 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 유의한 Caspase-3 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 유의한 HSP-72 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 성향정기산 투여군은 대조군에 비하여 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 유의한 HIF-1 α 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다.

참고문헌

1. 김영석. 임상증증학. 서울, 서원당, pp 303-308, 317-329. 1997.
2. Osborne, K.A., Shigeno, T., Balarsky, A.M., Ford, I., McCulloch, J., Teasdale, G.M., Graham, D.I. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 50, 402-410, 1987.
3. Nagasawa, H., Kogure, K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 20(8):1037-1043, 1989.
4. Garcia, J.H., Liu, K.F., Ho, K.L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*, 26(4):636-642, 1995.
5. Memezawa, H., Smith, M.L., Siesjo, B.K. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 23(4):552-559, 1992.
6. Aronowski, J., Cho, K.H., Strong, R., Grotta, J.C. Neurofilament proteolysis after focal ischemia: when do cells die after experimental stroke? *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(6):652-660, 1999.
7. 김영석. 중풍의 병인병리, 변증 및 치료. 한방성인병학회지, 1(1):113-140, 1995.
8. 康明吉. 濟衆新編. 서울, 행림서원, p 2, 1975.
9. 구본홍. 동의심계내과학. 서울, 서원당, pp 305-311, 1985.
10. 조황성, 고병희, 송일병. 소음인 성향정기산의 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집, 11, 166-174, 1988.
11. 이동운, 김영균. 배양된 혈관 내피세포에서 산화성 세포 손상에 미치는 성향정기산의 보호 효과. 병제학회지 8(1):147-167, 2000.
12. 김영균, 고우신, 김종훈. 성향정기산(星香正氣散)이 가토의 경동맥 평활근 긴장도 조절에 미치는 영향. 대한한의학회지 19(2):228-243, 1998.
13. 김영균, 권정남, 김종훈. 성향정기산이 가토의 경동맥 평활근 긴장 및 Ca²⁺대사에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 21(3):377-388, 2000.
14. 이기주, 김경요. 소음인 성향정기산이 백서의 혈압 및 국소뇌 혈류량에 미치는 영향. 사상의학회지 12(1):228-239, 2000.
15. 임준규, 변덕시, 노석선. 성향정기산(星香正氣散)이 뇌부종에 미치는 임상적 연구. 대한한의학회지 11(1):208-215, 1990.
16. 예경숙, 박치상, 이은주, 송지혜, 김미려, 조정숙. 성향정기산이 뇌허혈을 유발시킨 백서의 신경전달물질에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 21(1):116-125, 2000.
17. 김나리, 김영균, 권정남, 조수인. 성향정기산이 저산소 발작상태의 고양이 대뇌피질 절편의 이온 함량과 대사에 미치는 효과. 대한한방내과학회지 22(4):537-546, 2001.
18. Chen, J., Zhu, R.L., Nakayama, M. Expression of the apoptosis-effector gene, BAX, is upregulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem*, 67, 64-71, 1996.
19. Krupinski, J., Ferrer, I., Barrachina, M., Secades, J.J., Mercadal, J., Lozano, R. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacol*, 42(6):846-854, 2002.
20. Kinouchi, H., Sharp, F.R., Hill, M.P., Koistinaho, J., Sagar, S.M., Chan, P.H. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13, 105-115, 1993.
21. Li, Y., Zhou, C., Calvert, J.W., Colohan, A.R.T., Zhang, J.H. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1α and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol*, 191, 198-210, 2005.
22. Zea Longa E.L., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *stroke*, 20, 84-91, 1989.
23. Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17, 472-476, 1986.
24. Whishaw, I.Q., Mittleman, G., Bunch, S.T., Dunnett, S.B. Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behav Brain Res*, 24, 125-138, 1987.
25. Swanson, R.A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R.A., Davidson, C., Sharp, F.R. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blod Flow Metab*, 10(2):290-293, 1990.
26. Ginsberg, M.D., Busto, R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 20, 1627-1642, 1989.
27. Swan, J.H., Meldrum, B.S. Long term development of selective neuronal loss and the mechanism of protection by 2-amino-7-phosphonoheptanoate in a rat model of incomplete forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8, 64-78, 1988.
28. Zhang, R.L., Chopp, M., Chen, H., Garcia, J.H. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci*, 125, 3-10, 1994.
29. Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., Hu, X.J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation. *Stroke*, 26, 627-635, 1995.
30. Wahl, F., Allix, M., Plotkine, M., Boulu, R.G. Neurological

- and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 23, 267-272, 1992.
31. Nicholson, D.W. Mechanisms of apoptotic control. *Nature*, 407, 810-816, 2000.
 32. Gillardon, F., Wickert, H., Zimmermann, M. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci Lett*, 192, 85-88, 1995.
 33. Hara, A., Iwai, T., Niwa, M. Immunohistochemical detection of BAX and BCl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 711, 249-253, 1996.
 34. Patel, T., Gores, G., Kaufmann, S.H. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J*, 10, 587-597, 1996.
 35. Hara, H., Friedlander, R.M., Gagliardini, V. Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2007-2012, 1997.
 36. Welch, W.J. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 339, 327-33, 1993.
 37. Kinouchi, H., Sharp, F.R., Koistinaho, J., Hicks, K., Kamii, H., Chan, P.H. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*, 619, 334-338, 1993.
 38. Bergeron, M., Yu, A.Y., Solway, K.E., Semenza, G.L., Sharp, F.R. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischemia in rat brain. *Eur J Neurosci*, 11, 4159-4170, 1999.
 39. Brune, B., Brune, B., von Knethen A., Sandau, K.B. Transcription factors p53 and HIF-1alpha as targets of nitric oxide. *Cell Signal*, 13(8):525-533, 2001.